

内合22-68

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文審査報告書

論 文 題 目

ヘテロシスト型窒素固定ラン色細菌
ヒドロゲナーゼの水素生産に及ぼす影響
Hydrogenase and photobiological H₂ production
in N₂-fixing heterocystous cyanobacteria

申 請 者

増川 一

Hajime Masukawa

物理学及応用物理学

植物生理学

2003年 3月

大気中の二酸化炭素濃度は産業革命以降顕著な上昇を続け、これは人類による化石燃料消費の増大や土地利用形態の変化に密接に関連していると考えられている。二酸化炭素濃度増大を抑制するためには、化石燃料に代わる再生可能なエネルギー源の創出が人類社会にとっての大きな課題となっている。再生可能なエネルギー源として、最も期待されているのは太陽光である。地球表面が受けるそのエネルギー量は人類の社会的エネルギー消費量の 6,000 倍を超えるが、太陽光エネルギーは強度がそれほど高くないため、その経済的利用は容易でない。しかし、近代的農業においては、砂糖生産に見られるように光合成を利用した経済的エネルギー変換が相当程度に実現されている。したがって、合理的な研究戦略に基づいて研究開発を積み重ねることにより、再生可能なエネルギー源の創出の可能性があると考えられる。

本論文は、ラン色細菌による光生物的水素生産系の効率改善を目的として行った研究をまとめたものである。本論文は、4 章から構成されている。以下に各章の概要と評価を述べる。

第 1 章は、ラン色細菌の光生物的水素生産の基本事項についてまとめている。水素生産に関わる酵素は、ヒドロゲナーゼおよびニトロゲナーゼである。光生物的水素生産の理論的最大エネルギー変換効率はヒドロゲナーゼ系の方が優れているが、ヒドロゲナーゼは反応が可逆的であるため再吸収という難点がある。また、ヒドロゲナーゼは酸素感受性であるため、酸素発生型光合成と両立できず、好気明条件下での光合成による糖質の蓄積と嫌気明条件下での糖質分解による水素放出という二段階生産方式が必要である。一方、ヘテロシスト型窒素固定ラン色細菌は、光化学系 II を持たないヘテロシスト（異型細胞）を窒素固定のために分化させ、内部を嫌氣的に保つことによって酸素感受性ニトロゲナーゼを保護し、隣接する栄養細胞から酸素発生型光合成の産物である糖質を受け取ることにより連続的水素生産を実現させている。したがって長期的視点からは、操作の単純な後者のシステムの方が経済的水素生産に適していると判断される。ニトロゲナーゼ反応（窒素固定反応）では、空気中の窒素分子の固定と同時に、必然的副産物としての水素発生が起こる。ところが、ヒドロゲナーゼはニトロゲナーゼが生産した水素の再吸収に働き得るので、水素生産の妨害となる可能性が高い。他方、ヒドロゲナーゼは細胞内の酸素濃度を下げることにより、酸素感受性ニトロゲナーゼの保護に貢献している可能性も否定できない。このような状況を背景に、2 種類あるヒドロゲナーゼの生理的役割と水素生産に与える影響を調べるのが本研究の目的であるとまとめている。

第 2 章は、ヒドロゲナーゼ遺伝子破壊の水素生産およびニトロゲナーゼ活性に及ぼす影響について述べている。ヘテロシスト型窒素固定ラン色細菌 *Anabaena* PCC 7120 は取込み型ヒドロゲナーゼ Hup および双方向性ヒドロゲナーゼ Hox を持ち、その全ゲノム DNA 塩基配列が決定され、遺伝子導入法が確立さ

れている。この株をモデル生物として、それぞれの構造遺伝子 *hupL* と *hoxH* の一方および両方を破壊した 3 種の変異株、 $\Delta hupL$ 、 $\Delta hoxH$ 、 $\Delta hupL/\Delta hoxH$ を作製した。これらの変異株が所期のものであることは、DNA プローブを用いたサザンブロット解析により確認した。また、生化学的方法である細胞抽出液の酵素活性、電気泳動後の活性染色によっても確認した。以上のように、ラン色細菌において遺伝的背景が明らかな 3 種のヒドロゲナーゼ欠損株を作製したのは、本研究が世界で最初である。なお、上記の活性染色において、Hox に相当するもの以外にもう 1 つのバンドが検出されたが、その実体の解明は今後の課題である。

このように特徴づけのなされた 3 つの変異株および野生株を硝酸塩などの窒素源を含まないニトロゲナーゼ誘導培地に移して培養し、水素生産性とニトロゲナーゼ活性（アセチレン還元活性）、成長曲線（クロロフィル濃度）を経時的に測定した。水素生産活性の最大値を比較したところ、 $\Delta hupL$ 株は野生株の 4-7 倍の活性を示したが、 $\Delta hupL/\Delta hoxH$ 株は $\Delta hupL$ 株と比べてそれ以上の活性増大を示さなかった。 $\Delta hoxH$ 株は水素生産性増大につながらず、むしろ 15-33% 活性が低下していた。また、ニトロゲナーゼ活性を野生株と比較したとき、 $\Delta hoxH$ 株はわずかに（10% 以下）低かったが、 $\Delta hupL$ と $\Delta hupL/\Delta hoxH$ 株はそのような低下を示さなかった。 $\Delta hoxH$ 株の成長を野生株と比較したところ、空気プラス 1% CO₂ を通気した場合は差がなかったが、空気のみを通気した場合は有意に遅かった。

これらの結果を申請者は、次のようにまとめている。ニトロゲナーゼが生産する水素は、本実験条件下では主として Hup により再吸収されると結論された。Hup は吸収した水素を再利用し、細胞内の酸素濃度を下げ、酸素感受性であるニトロゲナーゼの保護に働いている可能性が考えられたが、 $\Delta hupL$ においてニトロゲナーゼ活性の低下が認められなかったことから、この株では他のニトロゲナーゼ保護機構が十分に機能していると結論された。したがって、ニトロゲナーゼによる水素生産にとって、*hup* 遺伝子破壊が有効であることが示された。一方、 $\Delta hoxH$ の結果は、Hox が窒素固定条件下で再吸収ではなく、余剰な還元力を排出するための調節弁として機能しているという Appelらの提案と調和している。

第 3 章は、ヘテロシスト型窒素固定ラン色細菌におけるヒドロゲナーゼの分布について述べている。日、仏、米国 3 ヶ所の藻類保存センターが所有する 15 株について *hup*, *hox* 両遺伝子の存否および活性を調べた。Hup 構造遺伝子から *hupL* プローブを、Hox 構造遺伝子から *hoxE*、*hoxF*、*hoxY*、*hoxH* プローブを作製し、サザンブロット解析を行ったところ、*hupL* 遺伝子は 15 種すべてに検出されたが、*hoxE, F, H* 遺伝子は 12 種だけで検出され、残り 3 種においては検出されなかった。Hox 活性染色法の結果および Hox による水素発生活性の測定結

果も *hox* 遺伝子の存否の結果と良く対応していた。以上の結果から、*hox* 遺伝子も活性も持たないものとして既報の *Nostoc* PCC 73102 に加えて新たに *Nostoc* IAM M 13、*Nostoc* IAM M 15 が見つかった。これら Hox を持たない 3 種には、興味深いことにコケ、菌類またはソテツと共生生活をすることができるといふ共通点が見られることを指摘し、Hox の生理的意義について討論を加えている。

第 4 章は、ヒドロゲナーゼ変異株の光から水素へのエネルギー変換効率について述べている。水素生産が最大活性時の *ΔhupL* 株細胞懸濁液を用い、アルゴン気相下で、光から水素へのエネルギー変換効率を経時的に測定した。励起光源には模擬太陽光スペクトルを出すハロゲンランプを用い、光合成有効照射 (PAR) のみを透過するフィルターを通して強度 5-250 W/m² PAR の範囲で照射したところ 200 W/m² PAR 以下では水素は照射開始 10-35 分にわたってほぼ直線的に増加した。250 W/m² PAR では、活性が時間と共に低下したが、これは光阻害のためと考えられる。励起光強度 5-50 W/m² PAR の間では、入射エネルギーに対する変換効率はほぼ一定で約 1.0-1.6% であった。光強度がこれを越えるにつれて効率は低下し、250 W/m² PAR で光照射 10-20 分の効率は 0.24%、20-30 分では 0.17% であった。

このように、ヘテロシスト型窒素固定ラン色細菌による水素生産においては、励起光強度が 50 W/m² PAR を超えると変換効率が急速に低下すること、また高い水素生産活性が 10 時間程度しか持続しない等の問題点が指摘されること、その克服に向けてさらに改良を加える必要があることが明らかになったことを述べ、研究の将来の方向性について総括している。

以上のように、申請者は、ラン色細菌の光生物的水素生産において、取込型ヒドロゲナーゼの遺伝子破壊が効率を向上させることを実証し、効率に及ぼす光強度等の影響と今後の改良の方向を明らかにすると共に、多数の株におけるヒドロゲナーゼ遺伝子の分布を明らかにした。

これらの成果は、ラン色細菌による光生物的水素生産実用化のための基礎的知識を提供するものである。

よって本論文は、博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。

2003 年 2 月

審査員

(主査)	早稲田大学教授	理学博士(東京大学)	櫻井英博
	早稲田大学教授	理学博士(東京大学)	伊野良夫
	早稲田大学教授	理学博士(早稲田大学)	並木秀男